

Literatur

1. TROLL, W. und R. K. CANNAN, J. biol. Chemistry 200, 803 (1953). — 2. MÜTING, D. und E. KAISER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 276 (1963). — 3. CONSTANTSAS, N. S. und C. DANELATOU-ATHANASSIADOU, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 9, 1 (1964). — 4. BERGER, H., M. BRENNER und H. VETTERLI-BÜCHNER, Aminoacidurie und Hyperaminoacidurie, Bibliotheca Paediatrica 71, S. Karger, Basel/New York (1959). — 5. BICKEL, H. und F. SOUCHON, Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde, (Beihefte zum Arch. Kinderhk., Stuttgart 31), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1955). — 6. SMITH, J., Chromatographic Techniques, William Heinemann, London (1958). — 7. WALZ, D., A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER und M. BRENNER, Experientia (Basel) 19, 213 (1963). — 8. PATAKI, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter & Co., Berlin (im Druck). — 9. DITTMANN, J., diese Z. 1, 190 (1963). — 10. DITTMANN, J., diese Z. 3, 59 (1965). — 11. DITTMANN, J., J. B. MAYER und M. WOLF, Zschr. Kinderhk. 94, 130 (1965).

Dr. rer. nat. Jürgen Dittmann,
Universitäts-Kinderklinik
665 Homburg-Saar

Dünnschicht-Chromatographie in der Klinik

IV. Mitteilung: Abtrennung von Phosphoethanolamin

Von J. DITTMANN¹⁾

Aus der Universitäts-Kinderklinik Homburg-Saar und der Landeskinderklinik Neunkirchen/Saar-Kohlhof
(Direktor: Prof. Dr. J. B. Mayer)

(Eingegangen am 22. März 1965)

Aminosäuren können an dünnen Zellosoeschichten durch zweidimensionale Chromatographie mit folgenden Lösungsmitteln getrennt werden: *Lösung a*: Wasser mit 60 Vol% n-Propanol und 20 mMol Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan, sowie 17,6 mMol HCl/l; — *Lösung b*: Wasser mit 70 Vol% Isopropanol. — Entwickelt wird 10 cm in jeder Richtung. Phosphoethanolamin wird unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar zersetzt.

Amino acids can be separated on thin-layers of cellulose by 2-dimensional chromatography with the following solutions: *solution a*: water with 60 Vol% n-Propanol and 20 mMol Tris-[hydroxymethyl]aminomethane and 17,6 mMol HCl/l; — *solution b*: water with 70 Vol% Isopropanol. — The plates are developed 10 cm in each direction. Under these conditions there is no detectable destruction of phosphoethanolamine.

Der Nachweis von Phosphoethanolamin (I) in Urinproben hat Bedeutung bei der Diagnostik von Hypophosphatasie (1). Chromatographiert man saure Lösungen (2–4), die I enthalten, so erhält man 2 Flecke: I und durch Hydrolyse von I gebildetes Aethanolamin. Aus diesem Grund wurde ein gepuffertes Lösungsmittel-System geprüft, das schonende Abtrennung von I auch bei verschiedener Wasserstoffionen-Konzentration der Analysenlösung ermöglicht.

Methodik

Lösung a

24,2 g Tris[hydroxymethyl]aminomethan werden in Wasser zu 1000 ml gelöst. 250 ml dieser Stammlösung werden mit 440 ml 0,1 n HCl versetzt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. — 4 Vol. des vorstehenden Puffers werden mit 6 Vol. n-Propanol vermischt.

Lösung b

3 Vol. Wasser werden mit 7 Vol. Isopropanol vermischt. Dünne Zellosoeschichten werden nach beschriebener Methode (2) auf Glasplatten hergestellt. Die Analysenprobe (1 µl wäßrige Lösung) wird auf möglichst kleinem Fleck 17 mm vom unteren und 20 mm vom linken Rand entfernt aufgetragen. — Entwickelt wird

10 cm mit Lösung a und nach halbstündiger Zwischentrocknung bei Raumtemperatur senkrecht zur ersten Laufrichtung 10 cm mit Lösung b. Nach Lufttrocknung der Platte wird mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und 15 bis 30 Min. auf 70° erwärmt.

Ergebnisse

0,2 µg I sind mit vorstehender Methode auf Dünnschicht-Chromatogrammen gut abtrennbar und nachweisbar. Es wird nur ein Fleck erhalten, dessen R_F -Werte sich von denen des Aethanolamins stark unterscheiden. Auch die Farbe, die man aus I und Ninhydrinreagenz nach Erwärmen erhält, unterscheidet sich von der Farbe der meisten Amine und Aminosäuren durch das Fehlen einer Rot-Komponente im Blau. Eine Verwechslungsmöglichkeit hinsichtlich R_F -Wert und Farbe des I-Flecks besteht nur bei Vorkommen von Asparaginsäure. Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methode wurden 5 Mischungen („A, B, C, D, E“) trennbarer Aminosäuren, Amide und Amine in Wasser hergestellt und je 4 mal chromatographiert. Die unteren Grenzen der Nachweisbarkeit und die R_F -Werte sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt. Hinter den R_F -Werten ist jeweils die mittlere Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert angegeben.

¹⁾ Technische Mitarbeit: G. LIEM.

Tab. 1

 R_F -Werte an Cellulose-Schichten R_{F1} : Chromatographie mit Lsg. a; R_{F2} : Chromatographie mit Lsg. b; (siehe „Methodik“)

Substanz	Menge (μg)	R_{F1}	R_{F2}	chromatographiert in Gemisch
L-Ornithin	0,08	$0,33 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$	A
L-Glutamin	0,4	$0,35 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$	B
L-Asparagin	0,5	$0,35 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$	B
L-Histidin	0,1	$0,36 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	E
DL-1-Methylhistidin	0,1			
L-Arginin	0,3	$0,38 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	D
L-Asparaginsäure	0,1	$0,39 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	C
Histamin	0,15	$0,41 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,04$	C
DL-Lysin	0,08	$0,41 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$	B
Phosphoethanolamin	0,2	$0,42 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04$	D
L-Citrullin	0,2	$0,42 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,01$	A
DL-Serin	0,1	$0,44 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	B
Glycin	0,05	$0,44 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,05$	D
L-Glutaminsäure	0,1	$0,48 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,05$	D
L-Hydroxyprolin	0,5	$0,49 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$	A
Taurin	0,1	$0,50 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,03$	E
D-Glucosamin	0,4	$0,51 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02$	B
Sarkosin	0,5	$0,51 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$	B
L-Alanin	0,08	$0,52 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,03$	A
β -Alanin	0,1	$0,53 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,04$	A
L-Threonin	0,2	$0,54 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,01$	C
L-Prolin	0,8	$0,57 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,04$	A
δ -Aminolaevulinsäure	0,5	$0,62 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,07$	D
Aethanolamin	0,05	$0,63 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,06$	D
DL-Tyrosin	0,2	$0,63 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,03$	E
DL- β -Amino-n-buttersäure	0,5	$0,64 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$	C
β -Amino-iso-buttersäure	0,1			
DL- α -Amino-n-buttersäure	0,1	$0,64 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,05$	E
α -Amino-iso-buttersäure	0,2			
γ -Amino-n-buttersäure	0,1			
DL-Tryptophan	0,2	$0,64 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,06$	D
DL-Valin	0,05	$0,66 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$	A
DL-Methionin	0,1	$0,68 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,02$	B
DL-Norvalin	0,15	$0,69 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,05$	A
DL-Phenylalanin	0,4	$0,74 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,03$	B
3,5-Dijod-L-tyrosin	0,8	$0,76 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,06$	E
DL-Isoleucin	0,05	$0,79 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,02$	C
DL-Leucin	0,05	$0,84 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,01$	C

Diskussion

Gegenüber der Trennung von sauren Aminosäure-Lösungen mit Propanol-Wasser und Isopropanol-Wasser (2—4) hat die hier beschriebene Methode drei Nachteile:

1. Die Dünnschicht färbt sich bei längerem Erhitzen und auch bereits bei mehr als eintägiger Lagerung infolge der Beladung mit „Tris“ und dem aus „Tris“ mit Ninhydrinreagenz entstehenden gefärbten Stoff in bestimmten Bereichen gelb und in anderen Bereichen bläulich an; Auswertung der Chromatogramme sollte deshalb wenige Stunden nach Anfärbung erfolgen.

2. Die Streuung der R_F -Werte, insbesondere auch die des R_F -Wertes von I, ist hoch. Eine wesentliche Ursache scheint unterschiedliche Dicke der Zellulose-Schichten zu sein. Man kann die Streuung kleiner halten, wenn man die Schichten unter möglichst konstanten Bedingungen (Streichgeschwindigkeit bei Verwendung eines Streichgerätes) herstellt. Die in der Tabelle angegebenen R_F -Werte wurden an Platten ermittelt, die nicht gemeinsam beschichtet worden waren.

3. Die unteren Grenzen der Nachweisbarkeit liegen meistens etwas höher als im ungepufferten System (2—4).

Der Vorteil der Methode liegt dagegen darin, daß die Hydrolyse von I wegen des fast neutralen pH-Wertes sehr klein gehalten wird und man aus I nur einen Fleck erhält. — Soll I in biologischen Flüssigkeiten nachgewiesen werden, so kann man, wie bereits beschrieben (4), die Analysenflüssigkeit ohne Aufarbeitung direkt auf die Platte auftragen und dann chromatographieren. Zur Erhöhung der Zuverlässigkeit der Methode empfiehlt es sich, auf einer zweiten Platte die gleiche Menge Analysenflüssigkeit plus $0,1 \mu\text{g}$ I aufzutragen und zu sehen, ob man auf dieser Platte nach Entwickeln und Anfärben an der Stelle, wo man nach den R_F -Werten I vermuten kann, einen oder zwei Flecke erhält.

Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Systems beruht in der Möglichkeit, die gleiche Analysenprobe in verschiedener Weise auf Dünnschichtplatten zu entwickeln und dadurch auch die Sicherheit des Nachweises anderer Aminosäuren zu erhöhen.

Literatur

1. SMITH, I., Chromatographic Techniques, S. 108, William Heinemann, London (1958). — 2. DITTMANN, J., diese Z. 1, 190 (1963),

— 3. DITTMANN, J., diese Z. 3, 59 (1965). — 4. DITTMANN, J., diese Z. 4, 8 (1965).

Dr. rer. nat. Jürgen Dittmann
Universitäts-Kinderklinik
665 Homburg-Saar